



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 9/51		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/47130 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. September 1999 (23.09.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01452 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. März 1999 (06.03.99)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, IL, JP, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 198 10 965.2 13. März 1998 (13.03.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): MANERO, Javier [ES/DE]; Platanenweg 26, D-65835 Liederbach (DE). FILBEY, Jennifer [US/DE]; Ludwig-Christ-Strasse 10, D-61476 Kronberg (DE). BODERKE, Peter [DE/DE]; Johannesallee 14; D-65929 Frankfurt (DE).</p>			

(54) Title: NANOPARTICLES, METHOD FOR PRODUCING NANOPARTICLES AND USE OF THE SAME

(54) Bezeichnung: NANOPARTIKEL, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to nanoparticles with a biocompatible, biodegradable polyelectrolyte complex consisting of polycations and polyanions, and at least one bioactive agent. The nanoparticles are obtained by additionally treating the polyelectrolyte complex with at least one cross-linking agent after it has been formed. The invention also relates to a method for producing said nanoparticles. An active agent in combined or non-combined form and an aqueous solution of an acidic polymer substance and a basic polymer substance are brought together and the polyelectrolyte is then produced in a nanoparticulate form or optionally, is converted into a nanoparticulate form. The invention is characterised in that the nanoparticulate polyelectrolyte complex is then treated with at least one cross-linking agent. The inventive nanoparticles can be used for applying bioactive agents. They have the advantages of being very stable, enabling the controlled release of active agents and not producing the burst effect. Due to the method by which they are produced, the inventive nanoparticles also only have very few residues of organic solvents.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Nanopartikel aufweisend einen biokompatiblen, biologisch abbaubaren Polyelektrolytkomplex aus Polykationen und Polyanionen sowie mindestens einen bioaktiven Wirkstoff, wobei die Nanopartikel dadurch erhältlich sind, daß der Polyelektrolytkomplex nach seiner Bildung zusätzlich mit mindestens einem Vernetzungsmittel behandelt wird. Des weiteren wird ein Verfahren zur Herstellung der oben genannten Nanopartikel offenbart, wobei man einen Wirkstoff in gebundener oder ungebundener Form, eine wässrige Lösung von einer sauren polymeren Substanz und einer basischen polymeren Substanz zusammenbringt und anschließend der Polyelektrolyt in nanopartikulärer Form entsteht oder gegebenenfalls in eine nanopartikuläre Form überführt wird, dadurch gekennzeichnet, daß der nanopartikuläre Polyelektrolytkomplex anschließend mit einem Vernetzungsmittel behandelt wird. Die Nanopartikel dienen zur Applikation von bioaktiven Wirkstoffen. Vorteilhaft ist insbesondere ihre hohe Stabilität sowie das kontrollierte Freisetzen der Wirkstoffe sowie die Vermeidung des Burst-Effektes. Des weiteren weisen die offenbarten Nanopartikel, bedingt durch das Herstellungsverfahren nur äußerst geringe Reste an organischen Lösungsmitteln auf.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Beschreibung

Nanopartikel, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

5

Die Erfindung betrifft Nanopartikel, Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln sowie die Verwendung von Nanopartikeln.

10

In der modernen pharmazeutischen Technologie werden Formulierungen und Wirkstoffkombinationen immer interessanter, deren Anwendungsform sich nicht nur auf eine schonende Weise applizieren läßt, sondern die auch gezielt Einfluß auf die Verteilung, Bioverfügbarkeit oder Resorption des Medikaments nehmen.

15

Insbesondere partikuläre Systeme, sogenannte Mikro- oder Nanopartikel, die eine Teilchengröße im Bereich kleiner als 100 µm aufweisen, haben sich als aussichtsreiche Applikationsformen erwiesen, um Pharmaka unterschiedlichster Art dem Körper zuzuführen.

20

Ein Dokument, das die Vorteile der oben genannten Nanopartikel beschreibt ist die WO 96/20698. Hierin wird insbesondere erläutert, daß die Oberfläche dieser Partikel auf mannigfache Weise modifiziert werden kann, um beispielsweise die Retentionszeit zu erhöhen. Es ist beispielsweise auch erwähnt, daß die Teilchen mit Antigenen versehen werden können, um so die Pharmaka, die sich in den Partikeln befinden sehr gezielt an ihrem vorgesehenen Wirkort freizusetzen. Problematisch ist jedoch, daß die Depotwirkung der Partikel relativ begrenzt ist, da die Freisetzung sehr rasch erfolgt. Die Stabilität der beschriebenen Partikel ist des weiteren relativ gering.

25

Eine weitere Druckschrift, die den Stand der Technik beschreibt, ist die WO 96/05810. Diese betrifft Mikropartikel, die Chitosan enthalten und positiv geladen sind. Durch eine teilweise Vernetzung der Partikel wird die Aufenthaltszeit der

30

Partikel auf den Schleimhäuten erhöht, so daß diese vermehrt in den Körper aufgenommen werden. Problematisch ist hierbei, daß die Partikel in Emulsionen hergestellt werden. Hierdurch ist es möglich, daß Reste des Lösungsmittels an bzw. in den Partikeln verbleiben. Dies wird insbesondere durch Adsorption des hydrophoben Lösungsmittels an hydrophobe Polymere oder bioaktive Substanzen, wie beispielsweise Proteine, verursacht. Diese Lösungsmittelreste sind insbesondere für pharmazeutische Anwendungen bedenklich. Die positive Ladung der Partikel, sie wird durch ein positives Zeta-Potential gemessen, kann des weiteren für die in der WO 96/20698 beschriebenen Modifikationen der Oberfläche von Nachteil sein.

Zudem sind die beschriebenen Mikropartikel im allgemeinen zu groß (1-100 µm), um eine effiziente Aufnahme durch biologische Membranen zu gewährleisten. Außerdem können größere Partikel (>5 µm) toxisch wirken, da sie in den feinen Blutkapillaren der Lunge stecken bleiben können.

Die Patentschriften US 5,449,720 und WO 92/17167 der BIOTECH AUSTRALIA offenbaren ähnliche Systeme mit denen die Resorption der Mikropartikel wesentlich erhöht werden kann. Diese Systeme verwenden Vitamin B12 oder Analoga, um die Aufnahme der Partikel im Verdauungstrakt zu steigern. Die oben erwähnten Probleme der raschen Freisetzung der Wirkstoffe, geringer Stabilität und Beladung werden jedoch auch in diesen Dokumenten nicht gelöst.

Die Patentschrift EP 0 454 044 B1 beschreibt die Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen in mikropartikulärer Form, die einen Polyelektrolytkomplex aus Polykationen und Polyanionen sowie mindestens einen Wirkstoff aufweisen. Hierdurch werden die oben beschriebenen Probleme der organischen Lösungsmittel gelöst. Allerdings weisen diese Partikel trotz ihrer ionischen Vernetzung häufig eine ungenügende Stabilität auf, so daß die Wirkstoffe kurz nach Verabreichung der Partikel schlagartig freigesetzt werden könnten.

Angesichts des hierin angegebenen und diskutierten Standes der Technik ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung Partikel anzugeben, welche dazu beitragen, die Nachteile der bekannten Partikeln zu vermeiden oder zu verringern.

5 Insbesondere ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Nanopartikel zur Verfügung zu stellen, die stabil sind und eine anfängliche schlagartige Freisetzung (sogenannter „Burst-Effekt“) des Wirkstoffes vermeiden sowie ihn kontrolliert freigeben.

10 Des weiteren ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung Nanopartikel anzugeben, die möglichst weitgehend frei von Resten organischer Lösungsmittel sind.

Noch eine Aufgabe ist in der Bereitstellung eines möglichst einfachen und vorteilhaften Verfahren zur Herstellung von Nanopartikeln zu sehen.

15 Schließlich ist auch die Angabe der Verwendung von Nanopartikeln Aufgabe der Erfindung.

Gelöst werden diese Aufgaben sowie weitere nicht explizit genannte Aufgaben, die aus den hierin diskutierten Zusammenhängen ableitbar oder erschließbar sind, 20 durch die im Anspruch 1 beschriebenen Maßnahmen. Zweckmäßige Abwandlungen der erfindungsgemäßen Nanopartikel, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung werden in eventuell nebengeordneten und in den auf Anspruch 1 rückbezogenen Unteransprüchen unter Schutz gestellt.

25 Dadurch, daß der biokompatible und biologisch abbaubare Polyelektrolytkomplex aus Polykationen und Polyanionen während oder nach seiner Bildung zusätzlich mit einem Vernetzungsmittel behandelt wird, werden Wirkstoffe, die in den Nanopartikeln vorhanden sind kontrolliert freigesetzt.

30 Durch die erfindungsgemäßen Maßnahme werden zusätzlich folgende Vorteile erzielt:

- Vermeidung einer schnellen Freigabe des Wirkstoffs kurz nach Verabreichung der Partikel („Burst-Effekt“).
- Empfindliche Wirkstoffe können durch die erfindungsgemäßen Nanopartikel hervorragend gegen Abbau geschützt werden, da sie gut in die Nanopartikel eingebettet sind.
- Hochwirksame Wirkstoffe können kontrolliert und sehr gezielt an ihrem Bestimmungsort freigesetzt werden, so daß eine geringere Arzneistoffdosis erforderlich ist und die unerwünschten Nebenwirkungen minimiert werden.
- Die Nanopartikel sind wesentlich stabiler als herkömmliche, ohne daß sie ihre biologische Abbaubarkeit verlieren.
- Die erfindungsgemäßen Partikel werden infolge ihrer geringen Größe besonders leicht resorbiert.
- Die Nanopartikel sind im wesentlichen frei von Resten organischer Lösungsmittel, da sie in wässriger Lösung gebildet werden können.
- Die Ladung des Polyelektrolytkomplexes kann durch die Vernetzung variiert werden, um die Hydrophilie der Partikel zu verändern. Dies bewirkt eine Modifikation der Bindung von Plasmaproteinen an die Nanopartikel. Des weiteren kann hierdurch auch die Retentionszeit der Partikel an den Schleimhäuten sowie die Verweilzeit der Partikel im Körper beeinflußt werden.
- Weitere Stoffe, die an der Oberfläche der Nanopartikeln gebunden sein können, werden durch die Vernetzung fester an die Partikel gebunden. Diese Stoffe können beispielsweise die Resorption der Partikel erhöhen, indem sie einen aktiven Transport der Partikel bewirken. Durch diese Maßnahme kann

eine kovalente Bindung dieser Stoffe an den Polyelektrolytkomplex vermieden werden. Hierdurch wird die biologische Abbaubarkeit verbessert.

5 - Zusätzlich kann durch diese Maßnahme das Quellvermögen bzw. die Wasseraufnahme des Partikels beeinflußt werden.

10 Im Sinne der Erfindung bezeichnet Nanopartikel Teilchen einer mittleren Größe von 10 bis 1000 nm, vorzugsweise 10 bis 500 und besonders bevorzugt 50 bis 250 nm, die einen biokompatiblen und biologisch abbaubaren Polyelektrolytkomplex aufweisen.

Die Form der Partikel kann regelmäßig oder unregelmäßig sein.

15 Der Begriff biokompatibel bedeutet hierin, daß die zur Herstellung des Polyelektrolytkomplexes vorzugsweise verwendeten Verbindungen bei Applikation verträglich, also beispielsweise nicht oder nur in vertretbarem Maße giftig sind und/oder nur eine sehr geringe allergene Wirkung entfalten. Damit keine Akkumulation der Polymere im Körper eintritt, sollen diese biologisch abbaubar oder ausscheidbar sein. Vorzugsweise sind die Polymere in Abhängigkeit ihres Einsatzes 20 auch biokompatibel.

25 Der Polyelektrolytkomplex kann durch das Zusammenbringen von Polyanionen und Polykationen entstehen, wie dies in der Patentschrift EP 0 454 044 B1 beschrieben ist. Je nach Verhältnis der polymeren Ionen kann die Oberfläche der gebildeten Nanopartikel positiv oder negativ geladen (ein positives oder negatives Zeta-Potential besitzen) oder ungeladen sein.

30 Als Polyanionen eignen sich hierfür alle negativ geladenen, biologisch abbaubaren oder ausscheidbaren Polymere. Hierzu können die Polysäuren insbesondere geladene Phosphonat-, Phosphat-, Sulfonat-, Sulfat- und/oder Carboxygruppen aufweisen. Bevorzugt sind, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll,

Heparin, Sumarin, Protaminsulfat, Polyvinyle, Polyallyle, Polystyrene und Polyacrylate, Derivate von Polyzuckern, wie beispielsweise Stärkehydrolysate, Inulin, Hydroxyethylstärke, Dextrane, Cellulosederivate, Alginate und Xylan, die Sulfatgruppen oder Carbonatgruppen aufweisen, wie Pektinat und Xylanpolysulfat sowie Polyamide, die Carbonatgruppen aufweisen, insbesondere Polyaminosäuren, wie Polyasparaginsäure und Polyglutaminsäure. Diese geladenen Polymere können auch teilweise substituiert sein oder als Salz vorliegen. Die Polyanionen können auch in copolymerer Form verwendet werden. Hierunter sind Copolymere von verschiedenen Monomeren, die zur Herstellung der oben aufgeführten Polyanionen dienen können, als auch Copolymere dieser Monomeren mit anderen biologisch abbaubaren Monomeren, wie sie zur Herstellung der weiter unten aufgeführten biologisch abbaubaren Polymeren verwendet werden können, zu verstehen. Mischungen dieser Polymere/Copolymere sind im Rahmen der vorliegenden Erfindungen ebenfalls geeignet. Bevorzugt ist hierbei Xylanpolysulfat sowie teilweise substituiertes Xylanpolysulfat.

Das Gewichtsmittel des Molekulargewichts der Polyanionen beträgt vorzugsweise 1 000 bis 2 000 000 Dalton, besonders bevorzugt 40 000 bis 600 000 Dalton. Sie sind im allgemeinen kommerziell erhältlich. Die Polyanionen können aber auch auf jede dem Fachmann bekannte Art und Weise hergestellt werden.

Zur Herstellung der Nanopartikel werden die Polyanionen vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1 bis 40 g/l, besonders bevorzugt 1 bis 20 g/l eingesetzt.

Als biologisch abbaubare oder ausscheidbare Polykationen eignen sich im Rahmen der Erfindung unter anderem, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll, Collagen und Collagenderivate, Gelatine, Poly-N-alkylvinylpyridine, Polyethylenimine, Polyvinylamine, Polyallylamine und Polyacrylate, Poly-L-Lysin, Poly- α , β -(dimethylaminoethyl)-D,L-aspartamid (PDAA), Copolymere aus PDAA und hydrophob verestertem Poly- α , β -(2-hydroxyethyl)-D,L-aspartamid (PHEA), Chitosan und Derivate, Lysinoctadecylester, aminierte Dextrane, aminierte Cyclodextrine,

aminierte Celluloseether, aminierte Pektine sowie deren jeweils teilweise substituierte Derivate und Salze. Die Polykationen können auch in copolymerer Form verwendet werden. Hierunter sind Copolymere von verschiedenen Monomeren, die zur Herstellung der oben aufgeführten Polykationen dienen können, als auch Copolymere dieser Monomeren mit anderen biologisch abbaubaren Monomeren, wie sie zur Herstellung der weiter unten aufgeführten biologisch abbaubaren Polymeren verwendet werden können, zu verstehen. Mischungen dieser Polymere/Copolymere sind im Rahmen der vorliegenden Erfindungen ebenfalls geeignet. Bevorzugt ist hierbei Chitosan, da dessen 10 besonders hohe Verträglichkeit anerkannt ist.

Das Gewichtsmittel des Molekulargewichts der Polykationen beträgt vorzugsweise 1 000 bis 2 000 000 Dalton, besonders bevorzugt 40 000 bis 600 000 Dalton. Ihre 15 Herstellung ist dem Fachmann bekannt. Sie sind im allgemeinen kommerziell erhältlich.

Zur Herstellung der Nanopartikel werden die Polykationen vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1 bis 40 g/l, besonders bevorzugt 1 bis 20 g/l eingesetzt.

20 Die Nanopartikel können weitere biokompatible und/oder biologisch abbaubare Polymere enthalten, die dem Fachmann bekannt sind. Beispielhaft, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll, seien folgende Polymere genannt: Polysaacharide, wie beispielsweise Dextran und dessen Derivate, Polyalkylcyanoacrylate, Polyalkohole, Polymethylidenmalonate, Polyester, wie 25 PLGA (polylactic-polyglycolic acid copolymer) und Polycaprolacton, Polyether, wie Polyethyenglycol, Polyanhydride, Polyalkylcyanoacrylate, Polyacrylamide, Polyphosphazene sowie biologisch abbaubare Polyamide und Polyurethane. Besonders bevorzugt sind hierbei Derivate der Polymere, die zusätzliche 30 funktionelle Gruppen aufweisen. Zu diesen funktionelle Gruppen gehören, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll, die Hydroxyl-, die Amino-, die Thiol, die Carbonyl-, die Thiocarbonyl-, die Imino-, die Carboxyl-, die Alkoxy carbonyl-, die

Carboxyamid-, die Phosphonat-, die Phosphat-, die Sulfonat-, die Sulfat- und die Epoxidgruppe.

Diese biologisch abbaubaren Polymere können auch in copolymerer Form 5 eingesetzt werden. Hierunter sind Copolymere von verschiedenen Monomeren, die zur Herstellung der oben aufgeführten biologisch abbaubaren Polymeren dienen können, zu verstehen. Mischungen dieser Polymere/Copolymere sind im Rahmen der vorliegenden Erfindungen ebenfalls geeignet.

10 Diese Polymere können dazu dienen die Stabilität der Nanopartikel zu variieren. Des weiteren können die Polymere dazu dienen die weiter unten genannten oberflächenmodifizierenden Mittel, die bioaktiven Wirkstoffe an die Nanopartikel zu binden und/oder die Wirkstoffe zu stabilisieren.

15 Das Gewichtsmittel des Molekulargewichts der Polymere beträgt mehr als 1 000, vorzugsweise 30 000 bis 2 000 000, besonders bevorzugt 50 000 bis 300 000 Dalton.

20 Zur Herstellung der Nanopartikel werden die biologisch abbaubaren Polymere vorzugsweise in einer Konzentration von 0 bis 100 g/l, besonders bevorzugt 0 bis 40 g/l eingesetzt.

25 Die Herstellung dieser Polymere sowie der Polysäuren bzw. Polybasen ist literaturbekannt. Ein Großteil dieser Polymere ist auch kommerziell erhältlich. Zusätzlich können noch weitere Zusatzstoffe in die Nanopartikel eingebaut werden, falls dies erwünscht ist. So können zum Beispiel Absorptionsverbesserer wie Phospholipide mit eingearbeitet werden.

30 Bioaktive Wirkstoffe sind Substanzen, die Eigenschaften oder das Verhalten von lebenden Systemen beeinflussen. Hierzu gehören, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll Therapeutika, Diagnostika, Kosmetika sowie

prophylaktisch wirkende Stoffe. Es soll hierbei darauf verwiesen werden, daß in besonderen Fällen der Stoff selbst nicht aktiv werden muß. Im Fall von Diagnostika sollen hierunter beispielsweise auch Kontrastmittel wie Sauerstoff oder Edelgase u.ä. verstanden werden.

5

Besonders interessante bioaktive Wirkstoffe sind beispielsweise aktive Peptide und Proteine, wie beispielsweise Insulin, Interferone, Enzyme, Somatropin, Erythropoietin, G-CSF, Humanes Wachstumshormon, Calcitonin, LHRH, Faktor VIII, tPA, Enkephaline, Glucagon, TRH, Thymopoietin, Thymopentin, Thymocartin sowie Analoge und Fragmente;

10

Enzyminhibitoren, wie beispielsweise HIV-Proteaseinhibitoren;

15

Antigene und Immunogene, zum Beispiel Influenzavironen oder Subeinheiten von Antigenen;

Ganglioside;

20

Antibiotika, wie β -Lactam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine, Monobactame, Carbapeneme u.a.), Aminoglykoside (z.B. Streptomycin), Tetracycline, Chloramphenicol, Makrolid-Antibiotika (z.B. Erythromycin), Lincomycine, Fosfomycin, Fusidinsäure, Polymyxine, Vancomycine u. Teicoplanin;

25

Lokalanästhetika;

Kontrazeptiva;

30

Analgetika, wie Hypnoanalgetika insbesondere Opium-Alkaloide, 4-Phenylpiperidin-Derivate (Pethidin), 3,3-Diphenylpropylamin-Derivate (Methadon), Fentanyl-Derivate, Tramadol sowie Nefopam und nicht-opioide Analgetika, Antipyretika und Antiphlogistika, insbesondere Derivate der Salicylsäure (z.B. Acetylsalicylsäure),

des Anilins (z.B. Paracetamol), der Anthranilsäure (Mefenaminsäure), des Pyrazols (Metamizol, Phenazon, Propyphenazon) u. von (Hetero)arylessig- u. -propionsäuren (Indometacin, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen), Glucocortico(stero)ide und Phenylbutazon-Derivate;

5

Antirheumatika, wie Oxyphenbutazon, Arylessig- u. -propionsäurederivate insbesondere Indometacin, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, Oxicame wie Piroxicam, Gold(I)-Präparate, D-Penicillamin, Chloroquin sowie Immunsuppressiva;

10

Hormone und Antagonisten, wie Peptid-Hormone, insbesondere Adrenocorticotropin, Vasopresin, Desmopressin, Parathormon, Somatostatin und Insulin, Steroid-Hormone, insbesondere Progesterone, Östrogene und Androgene, Prostaglandine und Nebennierenhormone, wie Adrenalin;

15

Cytostatika, wie beispielsweise Alkylierungsmittel, insbesondere Mechlorethamin, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Mephalan, Chlorambucil, Hexamethylmelamin, Thitepa, Busulfan, Carmustin, Iomustin, Semustin, Steptozocin und Dacarbazin;

20

Antimetaboliten, insbesondere Methotrexat, Fluoruracil, Floxuridin, Cytarabin, Mercaptopurin, Thioguanin, Pentostatin;

Alkaloide;

25

RNA, DNA, wie Nukleotide, Oligonukleotide, Polynukleotide, Gene oder Gensegmente, Plasmide und/oder Vektoren sowie deren Derivate, welche beispielsweise insbesondere bei HIV, rheumatoider Arthritis, Krebs, Hormonmangelerkrankungen, Bluthochdruck, Atherosklerose, Gefäßkrankheiten, viralen Infektionen sowie mangelnder endogener Synthese aktiver Peptide und Proteine verwendet werden;

Toxine oder Vaccine, wie bakterielle Vaccine, wie das Tetanus und das Choleratoxin, wie virale Vaccine, wie AIDS-Antigene oder virale Hepatitis-Komponenten;

5 Kohlenhydrate, wie Mono- oder Polysaccharide, Dextran, Agar, Agarose-Derivate, Protooglykane, wie Heparin, Heparan, Dermatansulfate;

Lipide, wie Phospholipide, Cholesterin, Triglyceride und Lipoproteine u.ä.

10 Es können auch Mischungen dieser bioaktiven Wirkstoffe verwendet werden.

Insbesondere für instabile Präparate sind die erfindungsgemäß Nanopartikel hervorragend geeignete Darreichungsformen, da die Partikel besonders stabil sind und somit die Wirkstoffe, beispielsweise Proteine, gegen Zersetzung durch z.B.

15 Magensäure schützen. Der Wirkstoff kann daher besonders gezielt freigesetzt werden, so daß z.B. nach oraler Verabreichung der Wirkstoff nicht schon im Magen oder Darm freigegeben wird, wo er abgebaut würde, sondern erst wenn er ins Blut aufgenommen worden ist.

20 Der Wirkstoff kann auf mindestens vier verschiedene Arten in bzw. auf die Nanopartikel gelangen:

1. Einschluß des Wirkstoffes bzw. des Wirkstoffgemisches, das sich in der Lösung befindet, bei Komplexfällung („Einfangen“ aus der Lösung).

25 2. Adsorption bzw. Absorption eines Wirkstoffes bzw. des Wirkstoffgemisches aus einer Lösung, mit der die bereits hergestellten Nanopartikel in Kontakt kommen (bei porösen Partikeln oder Gelen mit „Schwamm-Effekt“).

30 3. Ausfällen des Polyelektrolytkomplexes, wobei der Wirkstoff chemisch an einen Komplexpartner gebunden ist.

4. Einschluß durch Einsatz des Wirkstoffs/ Wirkstoffgemisches als
Polyelektrolytkomplexbildungspartner.

5 Zur Herstellung der Nanopartikel wird der bioaktive Wirkstoff/ das bioaktive
Wirkstoffgemisch vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1 bis 40 g/l, besonders
bevorzugt 1 bis 20 g/l eingesetzt.

10 Erfindungsgemäß wird der Polyelektrolytkomplex nach seiner Bildung zusätzlich mit
mindestens einem Vernetzungsmittel behandelt. Diese Verbindungen verknüpfen
die Polymere der Nanopartikel, so daß diese stabiler werden und pharmazeutische
Wirkstoffe, die in den Nanopartikeln enthalten sind, langsamer freigesetzt werden.

15 Zu diesen Vernetzungsmittel gehören, ohne daß hierdurch eine Einschränkung
erfolgen soll,

Aldehyde und Ketone, wie Formaldehyd, Glyoxal und Glutaraldehyd; Benzochinon

halogenierte Triazinderivate, wie

2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin,

20 2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin,

2,4-Dichlor-6-ethoxy-1,3,5-triazin,

2,4-Dichlor-6-phenoxy-1,3,5-triazin,

2-Chor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin,

2-Chor-4,6-diethoxy-1,3,5-triazin,

25 2-Chor-4,6-diphenoxy-1,3,5-triazin;

Phosphonium-Salze, wie

O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-trypyrrolidinophosphoniumchlorid,

O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-trypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat,

O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-trypyrrolidinophosphoniumperchlorat,

30 O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-trypyrrolidinophosphoniumtetrafluoroborat,

O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid,

O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat,
O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumperchlorat,
O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumtetrafluoroborat,
5 O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-trypyrrolidinophosphoniumchlorid,
O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-trypyrrolidiophosphoniumhexa-
fluorophosphat,
O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-trypyrrolidinophosphoniumperchlorat,
O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-trypyrrolidinophosphoniumtetra-
10 fluoroborat,
O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-tris(dimethylamino)phosphonium-
chlorid,
O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-tris(dimethylamino)phosphonium-
hexafluorophosphat,
15 O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-tris(dimethylamino)phosphonium-
perchlorat,
O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-tris(dimethylamino)phosphonium-
tetrafluoroborat,
O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxamido)-trypyrrolidinophosphoniumchlorid,
20 O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxamido)-trypyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat,
O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxamido)-trypyrrolidinophosphonium perchlorat,
O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxamido)-trypyrrolidinophosphonium tetrafluoroborat,
O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxamido)-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid,
25 O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxamido)-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluoro-
phosphat,
O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxamido)-tris(dimethylamino)phosphoniumperchlorat,
O-(5-Norbornen-2,3-dicarboxamido)-tris(dimethylamino)phosphoniumtetra-
fluoroborat,
30 O-(Benzotriazol-1-yl)-trypyrrolidinophosphoniumchlorid,
O-(Benzotriazol-1-yl)-trypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat,
O-(Benzotriazol-1-yl)-trypyrrolidinophosphoniumperchlorat,

O-(Benzotriazol-1-yl)-trypyrrolidinophosphoniumtetrafluoroborat,
O-(Benzotriazol-1-yl)-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid,
O-(Benzotriazol-1-yl)-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat,
O-(Benzotriazol-1-yl)-tris(dimethylamino)phosphoniumperchlorat,
5 O-(Benzotriazol-1-yl)-tris(dimethylamino)phosphoniumtetrafluoroborat,
O-(N-Maleinimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumchlorid,
O-(N-Maleinimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat,
O-(N-Maleinimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumperchlorat,
O-(N-Maleinimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumtetrafluoroborat,
10 O-(N-Maleinimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid,
O-(N-Maleinimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat,
O-(N-Maleinimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumperchlorat,
O-(N-Maleinimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumtetrafluoroborat,
O-(N-Succinimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumchlorid,
15 O-(N-Succinimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat,
O-(N-Succinimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumperchlorat,
O-(N-Succinimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumtetrafluoroborat,
O-(N-Succinimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid,
O-(N-Succinimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat,
20 O-(N-Succinimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumperchlorat,
O-(N-Succinimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumtetrafluoroborat,
O-(N-Phthalimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumchlorid,
O-(N-Phthalimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat,
O-(N-Phthalimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumperchlorat,
25 O-(N-Phthalimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumtetrafluoroborat,
O-(N-Phthalimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid,
O-(N-Phthalimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat,
O-(N-Phthalimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumperchlorat,
O-(N-Phthalimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumtetrafluoroborat,
30 O-(N-Perhydrophthalimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumchlorid,
O-(N-Perhydrophthalimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat,

O-(N-Perhydrophthalimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumperchlorat,
O-(N-Perhydrophthalimidyl)-trypyrrolidinophosphoniumtetrafluoroborat,
O-(N-Perhydrophthalimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid,
O-(N-Perhydrophthalimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat,
5 O-(N-Perhydrophthalimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumperchlorat,
O-(N-Perhydrophthalimidyl)-tris(dimethylamino)phosphoniumtetrafluoroborat,
Tris-di-methyl-amino-chloro-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-di-methyl-amino-bromo-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-di-methyl-amino-cyano-phosphonium-hexafluorophosphat,
10 Tris-di-methyl-amino-isothiocyanato-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-di-methyl-amino-azido-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-di-methyl-amino-trichlormethyl-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-di-methylamino-trifluoromethyl-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-di-methyl-amino-phenoxy-phosphonium-hexafluorophosphat,
15 Tris-di-methyl-amino-p-nitrophenoxy-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-pyrrolidino-chloro-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-pyrrolidino-bromo-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-pyrrolidino-cyano-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-pyrrolidino-isothiocyanato-phosphonium-hexafluorophosphat,
20 Tris-pyrrolidino-azido-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-pyrrolidino-trichlormethyl-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-pyrrolidino-trifluoromethyl-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-pyrrolidino-phenoxy-phosphonium-hexafluorophosphat,
Tris-pyrrolidino-p-nitrophenoxy-phosphonium-hexafluorophosphat;
25 Uronium-Salze, wie
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumchlorid,
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumhexafluorophosphat,
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumperchlorat,
30 1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumtetrafluoroborat,
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-biscyclopentylidenuronium- chlorid,

1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumhexafluorophosphat,
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumperchlorat,
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumtetrafluoroborat,
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumchlorid,
5 1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat,
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumperchlorat,
1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyl-uroniumtetrafluoroborat,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-biscyclohexylidenuroniumchlorid,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-biscyclo-hexylidenuroniumhexafluoro-
10 phosphat,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-biscyclo-hexylidenuroniumperchlorat,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-biscyclo-hexylidenuroniumtetra-
fluoroborat,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-biscyclo-pentylidenuroniumchlorid,
15 3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-biscyclopentylidenuroniumhexafluoro-
phosphat,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-biscyclo-pentylidenuroniumperchlorat,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-biscyclo-pentylidenuroniumtetra-
fluoroborat,
20 3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-N,N,N',N'- tetramethyluroniumchlorid,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexa-
fluorophosphat,
3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-N,N,N',N'- tetramethyluronium-
perchlorat,
25 3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl-oxy-N,N,N',N'- tetramethyluroniumtetra-
fluoroborat,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-biscyclohexylidenuroniumchlorid,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-biscyclohexylidenuroniumhexafluorophosphat,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-biscyclohexylidenuroniumperchlorat,
30 5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-biscyclohexylidenuronium-tetrafluoroborat,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-biscyclopentylidenuroniumchlorid,

5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-biscyclopentylidenuroniumhexafluorophosphat,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-biscyclopentylidenuroniumperchlorat,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-biscyclopentylidenuroniumtetrafluoroborat,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumchlorid,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluoro-
phosphat,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumperchlorat,
5-Norbornen-2,3-dicarboxamido-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-biscyclohexylidenuroniumchlorid,
Benzotriazol-1-yl-oxy-biscyclohexylidenuronium-hexafluorophosphat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-biscyclohexylidenuroniumperchlorat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-biscyclohexylidenuroniumtetrafluoroborat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-biscyclopentylidenuroniumchlorid,
Benzotriazol-1-yl-oxy-biscyclopentylidenuroniumhexafluorophosphat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-biscyclopentylidenuroniumperchlorat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-biscyclopentylidenuroniumtetrafluoroborat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumchlorid,
Benzotriazol-1-yl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumperchlorat,
Benzotriazol-1-yl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat,
N-Maleimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumchlorid,
N-Maleimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumhexafluorophosphat,
N-Maleimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumperchlorat,
N-Maleimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumtetrafluoroborat,
N-Maleimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumchlorid,
N-Maleimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumhexafluorophosphat,
N-Maleimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumperchlorat,
N-Maleimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumtetrafluoroborat,
N-Maleimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumchlorid,
N-Maleimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat,
N-Maleimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumperchlorat,

N-Maleimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat,
N-Succinimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumchlorid,
N-Succinimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumhexafluorophosphat,
N-Succinimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumperchlorat,
5 N-Succinimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumtetrafluoroborat,
N-Succinimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumchlorid,
N-Succinimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumhexafluorophosphat,
N-Succinimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumperchlorat,
N-Succinimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumtetrafluoroborat,
10 N-Succinimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumchlorid,
N-Succinimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat,
N-Succinimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumperchlorat,
N-Succinimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat,
N-Phthalimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumchlorid,
15 N-Phthalimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumhexafluorophosphat,
N-Phthalimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumperchlorat,
N-Phthalimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumtetrafluoroborat,
N-Phthalimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumchlorid,
N-Phthalimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumhexafluorophosphat,
20 N-Phthalimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumperchlorat,
N-Phthalimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumtetrafluoroborat,
N-Phthalimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumchlorid,
N-Phthalimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat,
N-Phthalimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumperchlorat,
25 N-Phthalimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumchlorid,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumhexafluorophosphat,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-biscyclohexylidenuroniumperchlorat,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-biscyclohexylidenuronium tetrafluoroborat,
30 N-Perhydrophthalimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumchlorid,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumhexafluorophosphat,

N-Perhydrophthalimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumperchlorat,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-biscyclopentylidenuroniumtetrafluoroborat,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumchlorid,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat,
5 N-Perhydrophthalimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumperchlorat,
N-Perhydrophthalimidyl-oxy-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat;

Derivate des Hydroxylamins, wie

Kohlensäure-bis-(1,2-dihydro-2-oxo-1-pyridyl)ester,
10 Kohlensäure-bis-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)ester,

Kohlensäure-bis-(5-norbornen-2,3-dicarboxamido)ester,

Kohlensäure-bis-(benzotriazol-1-yl)ester,

Kohlensäure-bis-(N-maleinimidyl)ester,

Kohlensäure-bis-(N-succinimidyl)ester,

15 Kohlensäure-bis-(N-phthalimidyl)ester,

Kohlensäure-bis-(N-perhydrophthalimidyl)ester,

Oxalsäure-bis-(1,2-dihydro-2-oxo-1-pyridyl)ester,

Oxalsäure-bis-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)ester,

Oxalsäure-bis-(5-norbornen-2,3-dicarboxamido)ester,

20 Oxalsäure-bis-(benzotriazol-1-yl)ester,

Oxalsäure-bis-(N-maleinimidyl)ester,

Oxalsäure-bis-(N-succinimidyl)ester,

Oxalsäure-bis-(N-phthalimidyl)ester,

Oxalsäure-bis-(N-perhydrophthalimidyl)ester,

25 Pyrokohlensäure-bis-(1,2-dihydro-2-oxo-1-pyridyl)ester,

Pyrokohlensäure-bis-(3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)ester,

Pyrokohlensäure-bis-(5-norbornen-2,3-dicarboxamido)ester,

Pyrokohlensäure-bis-(benzotriazol-1-yl)ester,

Pyrokohlensäure-bis-(N-maleinimidyl)ester,

30 Pyrokohlensäure-bis-(N-succinimidyl)ester,

Pyrokohlensäure-bis-(N-phthalimidyl)ester,

Pyrokohlensäure-bis-(N-perhydrophthalimidyl)ester; und

reaktive Kohlensäurederivate, wie Carbodiimide insbesondere N-(3-

5 Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid.

Mittel, die Ester- oder Amidgruppen bilden, sind bevorzugt, da die entstehenden Ester- oder Amidgruppen besonders gut biologisch abgebaut werden können.

Hierzu gehören alle halogenierte Triazinderivate, alle Phosphonium-Salze, alle 10 Uronium-Salze und reaktive Kohlensäurederivate. N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDAP) und O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Tetrafluoroborat (TSTU) sind hierbei besonders bevorzugt.

Der Vernetzungsgrad kann durch die Konzentration des Polyelektrolytkomplexes 15 und des Vernetzungsmittels sowie die Reaktionszeit beeinflußt werden.

Die Reaktionszeit ist unter anderem von Art, Reaktivität und Konzentration des gewählten Vernetzungsmittels und des Polyelektrolytkomplexes sowie der Reaktionstemperatur und dem pH Wert der Lösung abhängig. Sie kann unter 20 Umständen durch Katalysatoren beeinflußt werden. Sie beträgt bei Raumtemperatur vorzugsweise 1 Minute bis 24 Stunden, besonders bevorzugt 5 bis 120 Minuten.

Die Oberfläche der Nanopartikel kann modifiziert werden. Diese Modifikation ist in den oben genannten Patentanmeldungen WO 96/20698, US 5,449,720 und 25 WO 92/17167 beschrieben, die hierdurch in die Offenbarung mit einbezogen werden sollen.

Durch die Modifikation können die Eigenschaften der Nanopartikel gezielt beeinflußt werden. So können zum Beispiel antithrombozytische Eigenschaften erzeugt, die 30 Aufnahme der Partikel über den Darm kann verbessert oder es können Stoffe an die Partikel gebunden werden, so daß die Partikel an ganz definierten Bereichen im

Körper angereichert werden. Als Beispiel seien hier Antigene gegen Krebszellen genannt, die mit den Partikeln verbunden werden können, so daß die Arzneimittel direkt bei den Krebszellen aus den Wirkstoff gesättigten Pharmadepots freigesetzt werden.

5

Diese Modifikation kann dadurch erreicht werden, daß zumindest eines der geladenen Polymere des Polyelektrolytkomplexes vor, während oder nach Bildung des Komplexes zusätzlich mit einem Mittel behandelt wird, welches die Oberfläche modifiziert. Zu diesen Mitteln gehören, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll, verschiedene synthetische Polymere, Biopolymere, niedermolekulare Oligomere, Naturstoffe und oberflächenaktive Stoffe.

10

Zu den synthetischen Polymere, mit denen die Oberfläche der Nanopartikel modifiziert werden können, gehören Carboxymethylcellulose, Cellulose, Celluloseacetat, Cellulosephthalat, Polyethylenglykol (Carbowachs), Polyvinylalkohol (PVA), Hydroxypropylmethylcellulosephthalat, Hydroxypropylcellulose, Natrium- oder Kaliumsalze der Carboxymethylcellulose, Polyvinylpyrolidon, Polystyrol und Silikate, wie Bentonit.

15

20

Zu den Biopolymeren, mit denen die Oberfläche der Nanopartikel modifiziert werden können, gehören insbesondere Proteine und Peptide, wie Gelatine, Casein, Albumine (Ovalbumin), Myoglobin, Hämoglobin, monoklonale und polyklonale Antikörper, Cytokine, wie Wachstumsfaktoren, Interferone, Lymphokine, Monokine, Interleukine und Chemokine; sowie Polysaccharide und Pectine.

25

Zu den Naturstoffen, mit denen die Oberfläche der Nanopartikel modifiziert werden können, gehören insbesondere Cofaktoren, wie Coenzyme, wie Vitamine, insbesondere Vitamin B12, und prosthetische Gruppen, wie die Häm-Gruppe; Lipide, insbesondere Phospholipide, wie Lecithin, und Cholesterin; und Prostaglandine.

30

Zu den oberflächenaktiven Stoffen, mit denen die Oberfläche der Nanopartikel modifiziert werden können, gehören nichtiinoische Tenside, insbesondere Sorbitan-Fettsäureester, insbesondere Polyoxyethylen-Sorbitan-Fettsäureester, Fettalkohole, wie Cetylalkohole oder Stearylalkohole, und Polyethersulfonate;

5 anionische Tenside, insbesondere Natriumdodecylsulfat, Fettsäuren (beispielsweise Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure), Glycerinester von Fettsäuren (beispielsweise Glycerinmonostearat) sowie Natrium- und Kaliumsalze von Fettsäuren (Natriumoleat, Natriumpalmitat, Natriumstearat, u.ä.), Polyoxytlstearat, Polyoxyethylenlaurylether, Sorbitansesquioleat und Triethanolamin; und

10 kationische Tenside, insbesondere Didodecyldimethylammoniumbromid, Cetyltrimethylammoniumbromid, Benzalkoniumchlorid, Hexadecyltrimethylammoniumchlorid, Dimethyldodecylaminoprpan, N-Cetyl-N-ethylmorpholiniummethosulfat.

15

Zu diesen Mitteln, mit denen die Oberfläche der Nanopartikel modifiziert werden können, gehören bevorzugt Mittel, die einen aktiven Transport (beispielsweise Resorption) der Partikel ermöglichen. Diese Mittel sind als Carrier bekannt.

20

Zu diesen Carriern gehören unter anderem Gallensäuren, Adhesine, Invasine, Toxine, wie zum Beispiel Pflanzen- oder Bakterientoxine, Cobalamine, virale Hämaglutinine, Lectine, Transferrin, Riboflavin sowie Peptide, die intestinal transportiert werden (die Carriersysteme für den intestinalen Peptid-Transport verwenden). Derivate dieser Stoffe, die ebenfalls die jeweiligen Carrier-Systeme verwenden, können ebenfalls eingesetzt werden.

25

Cobalamine, die als Carrier geeignet sind, umfassen beispielsweise Stoffe, wie Vitamin B12 oder Analoga, die an den intrinsic factor (IF), ein Glykoprotein des Magensaftes, binden. Durch diese Bindung werden die Nanopartikel aktiv von den Schleimhäuten aus dem Verdauungstrakt resorbiert. Zu den Analoga gehören beispielsweise, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll,

30

Aquocobalamin, Adenosylcobalamin, Methylcobalamin, Hydroxycobalamin, Cyanocobalamin, Carbanalid und 5-Methoxybenzalcyanocobalamin sowie die Desdimethyl-, Monoethylamid- und Methylamid-Derivate der zuvor genannten Verbindungen. Des weiteren gehören zu diesen Analoga Chlorocobalamin-, 5 Sulfitcobalamin-, Nitrocobalamin-, Thiocyanatocobalamin-, Benzimidazolecyanocobalamin-Derivate, wie beispielsweise 5,6-Dichlorbenzimidazol, 5-Hydroxybenzimidazol, Trimethylbenzimidazol, sowie Adenosylcyanocobalamin [(Ade)CN-Cbl], Cobalaminlaction, Cobalaminlactam sowie die Anilid-, Ethylamid, Monocarboxyl- und Dicarboxyl-Derivate des Vitamin B12 oder der entsprechenden Analoga. Weitere Analoga des Vitamin B12 ergeben sich 10 durch die Substitution des Cobaltatoms durch Zink oder Nickel.

Diese oberflächenmodifizierenden Mittel können im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch als Mischungen verwendet werden, um die verschiedenen 15 Eigenschaften der oberflächenmodifizierenden Mittel zu kombinieren oder um synergistische Wirkungen zu erzielen.

Zur Herstellung der Nanopartikel werden die oberflächenmodifizierenden Mittel vorzugsweise in einer Konzentration von 0 bis 200 g/l, besonders bevorzugt 0 bis 20 20 g/l eingesetzt.

Diese oberflächenmodifizierenden Mittel können direkt in die wäßrige Lösung gegeben werden. Bevorzugt können diese Mittel kovalent oder ionisch an mindestens eines der hydrophilen Polymere, an das Vernetzungsmittel oder an die 25 weiteren oben genannten biokompatiblen und biologisch abbaubaren Polymere sowie an den bioaktiven Wirkstoff gebunden werden, um sie so möglichst fest mit dem Polyelektrolytkomplex zu verbinden.

Hierzu können die oberflächenmodifizierenden Mittel mit weiteren Stoffen aktiviert 30 werden. Es ist aber auch möglich die hydrophilen Polymere, die Vernetzungsmittel oder an die weiteren oben genannten biokompatiblen und biologisch abbaubaren

Polymere sowie an den bioaktiven Wirkstoff zu aktivieren, um danach diese Stoffe mit den oberflächenmodifizierenden Mittel zusammenzubringen. Zu diesen

Aktivatoren gehören beispielsweise, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll, Disuccinimidylsüberat, Bis(sulfoauccinimidyl)süberat, Ethylenglycol-

5 bis(succinimidylsuccinat), Ethylenglycol-bis(sulfosuccinimidylsuccinat),

p-Aminophenylsäure, Dithio-bis(succinimidylpropionat), 3,3'Dithio-

bis(sulfosuccinimidylpropionat), Disuccinimidyltartrat, Disulfosuccinimidyltartrat,

bis[2-(Succinimidooxycarbonyloxy)-ethylen]sulfon,

bis[2-(Sulfosuccinimidooxycarbonyloxy)-ethylen]sulfon,

10 N,N'-Dimethyladipinsäurediamid*2HCl, N,N'-Dimethylpimelinsäurediamid*2HCl,

N,N'-Dimethylsüberinsäurediamid*2HCl. Des weiteren können Epoxide als

Aktivatoren verwendet werden. Zu diesen Epoxiden gehören beispielsweise

Ethylenoxid, 1,2-Propylenoxid, Glycidylether, wie Diglycidylbutandiolether,

Diglycidylethandiolether, und Erythritolanhydrid.

15

Es können aber auch Aktivatoren eingesetzt werden, die eine Thiolgruppe besitzen und so besonders gut biologisch abbaubar sind. Zu diesen Aktivatoren gehören beispielsweise N-Succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionat, Iminothiolan,

Sulfosuccinimidyl-6-[3-(2-pyridylthio)propionamido]hexanoat, Succinimidyl-6-[3-(2-

20

pyridylthio)propionamido]hexanoat, Sulfosuccinimidyl-6-[α -methyl- α -(2-pyridyl-

dithio)toluamido]hexanoat, 1,4-Di[3'-(2'pyridylthio)propionamido]butan, 4-

-Succinimidoxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridylthio)toluol, Dimethyl-

3,3'Dithiobispropionimidat*2HCl.

25

Diese Aktivatoren können allein oder als Mischung verwendet werden.

Zur Herstellung der Nanopartikel werden die Aktivatoren vorzugsweise in einer

Konzentration von 0 bis 40 g/l, besonders bevorzugt 0 bis 2 g/l.

30

Dies ist in den Patentanmeldungen WO 96/20698, US 5,449,720 und WO 92/17167 beschrieben.

Die Nanopartikel können beispielsweise durch Polyelektrolytkomplexierung, Emulsionstechniken, Sprühtrocknung, Solvent evaporation, Lösungsmittelextraktion, Koazervation, Extrusion, Fällung sowie Filtration oder anderen dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden.

5

Bevorzugt werden die Nanopartikel durch Polyelektrolytkomplexierung erzeugt. Die Nanopartikel können durch Zusammenbringen einer wäßriger Lösung von Polykationen, einer wäßriger Lösung von Polyanionen und mindestens einem bioaktiven Wirkstoff sowie gegebenenfalls weiterer Stoffe (weitere Polymere, Hilfsstoffe usw.), die an eines der beiden ionischen Polymere gebunden sein können oder der in freier Form vorliegen können, und anschließender Behandlung mit einem Vernetzungsmittel erhalten werden.

10

Das Zusammenbringen der mindestens zwei wäßrigen Lösungen der hydrophilen Polymere erfolgt so, daß sich Nanopartikel der gewünschten Größe und Größenverteilung bilden. Dies kann beispielsweise durch kontrolliertes Zutropfen einer der beiden Lösungen in die andere der beiden Lösungen geschehen. Der sich bei dem Mischen bildende Komplex fällt infolge von Neutralisation aus. Es kann erforderlich sein, daß zur Lösung der Stoffe, wie beispielsweise der Polymere, bioaktiven Wirkstoffe, usw., der pH-Wert eingestellt werden muß. Diese pH-Werte sind unter anderem von dem jeweiligen Polyelektrolyten abhängig und dem Fachmann bekannt. Bei bevorzugten Ausführungsformen kann sich der Fachmann beispielsweise am isoelektrischen Punkt orientieren. Die Teilchengröße läßt sich durch die Art und Weise des Zusammenbringens, beispielsweise beim Zutropfen die Verdünnung der mindestens zwei Lösungen, die Geschwindigkeit des Rührers, den pH-Wert sowie Durchmesser der beim Zutropfen verwendeten Düsen und Tropfgeschwindigkeit, steuern. Die Teilchengröße kann aber zusätzlich durch Ultraschall beeinflußt werden.

20

25

30

In besonders bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens kann auf weitere Hilfsstoffe verzichtet werden. Diese

Hilfsstoffe können aber je nach bioaktivem Wirkstoff, beispielsweise als Lösungsvermittler, notwendig sein. Hilfsstoffe können auch bei der Behandlung mit dem Vernetzungsmittel unverzichtbar sein.

5 Es können aber je nach bioaktivem Wirkstoff und je nach verwendetem Polymer verschiedene Emulsionsverfahren angewendet werden. Dies kann beispielsweise notwendig sein, falls in die Nanopartikel besonders hydrophobe Wirkstoffe oder zusätzlich hydrophobe Polymere eingebracht werden sollen. Diese Emulsionsverfahren sind in der WO 96/05810 beschrieben.

10 Hierbei wird beispielsweise eines der hydrophilen Polymere in Wasser gelöst. Diese Lösung wird unter starkem Rühren in ein unpolares Lösungsmittel gegeben indem der hydrophobe Wirkstoff gelöst ist. Anschließend kann beispielsweise das zweite der hydrophilen Polymere in die entstandene Emulsion zugegeben werden, so daß 15 der Polyelektrolytkomplex gebildet wird. Dieser Komplex kann durch Zugabe eines der oben genannten Vernetzungsmittel *in situ* vernetzt werden. Es ist bevorzugt, daß diese Emulsion durch geeignete Mittel, beispielsweise Dioctylsulphosuccinat stabilisiert wird.

20 Ein unpolares Polymer kann ebenfalls in einem hydrophoben Lösungsmittel gelöst werden, um dieses in den Polyelektrolytkomplex einzubringen. Falls sowohl ein hydrophober bioaktiver Wirkstoff als auch ein unpolares Polymer in den Polyelektrolytkomplex eingebracht werden sollen, ist es möglich, das oben erläuterte Verfahren leicht zu variieren, so daß eine mehrfache Emulsion (Öl-in- 25 Wasser-in-Öl-Emulsion) gebildet wird.

30 Die Partikel können auch durch Sprühtrocknung entstehen. Hierbei wird eine geeignete Lösung aus mindestens einem Polyanion, mindestens einem Polykation und mindestens einem bioaktiven Wirkstoff sowie gegebenenfalls weiterer Stoffe durch eine entsprechende Düse gesprührt, so daß Partikel der gewünschten Größe entstehen. Diese Partikel werden anschließend getrocknet.

Die entstandenen Partikel können durch Zugabe von Vernetzungsmitteln *in situ* vernetzt werden, um die erfindungsgemäßen Nanopartikel zu erhalten. Hierzu kann beispielsweise eines der oben genannten Vernetzungsmittel zugegeben und vorzugsweise bei Raumtemperatur je nach gewünschtem Vernetzungsgrad und 5 Vernetzungsmittel für weitere 10 Minuten bis 24 Stunden gerührt werden. Die exakte Vorschrift für die Umsetzung der Partikel ist vom Vernetzungsmittel abhängig und kann vom Fachmann mit wenigen Routineversuchen optimiert werden.

Die Bestimmung der Vernetzung kann mittels literaturbekannter Methoden wie NMR, 10 NIR oder Ausschlußchromatographie erfolgen.

Die entstandenen Partikel, die einen Polyelektrolytkomplex sowie zumindest einen bioaktiven Wirkstoff enthalten, können aber auch später vernetzt werden. Hierzu können diese Partikel in einem geeigneten Lösungsmittel, beispielsweise Wasser 15 oder ein dipolar aprotisches Lösungsmittel, wie DMF (Dimethylformamid) oder DMSO (Dimethylsulfoxid), aufgenommen werden. In diese Lösung kann dann eines der oben genannten Vernetzungsmittel gegeben und mit dem Polyelektrolytkomplex so umgesetzt werden, daß dieser zusätzlich vernetzt wird. Dies kann beispielsweise durch Rühren für 10 Minuten bis 24 Stunden bei 20 Raumtemperatur geschehen.

Die Partikel können anschließend isoliert werden. Diese Abtrennung kann beispielsweise durch Filtration oder Zentrifugation erfolgen. Die Partikel werden vorzugsweise anschließend mit Wasser gewaschen und beispielsweise durch 25 Lyophilisation getrocknet.

Die so erhaltenen Nanopartikel können durch Bestrahlung sterilisiert werden, wie dies in der Fachwelt weithin bekannt ist. Die Nanopartikel können aber auch unter sterilen Bedingungen hergestellt werden.

Die Partikel können auf jede dem Fachmann bekannte Art verabreicht werden. Hierzu gehören insbesondere, ohne daß hierdurch eine Einschränkung erfolgen soll, die orale Applikationsform. Sie können beispielsweise aber auch parenteral zum Beispiel durch Injektion intravenös, intraarteriell, intramuskulär, subkutan, intrathekal oder intralumbal appliziert werden. Die Nanopartikel können des weiteren nasal, 5 ocular, rectal, vaginal, buccal, oral, transdermal sowie durch Inhalation verabreicht werden.

Die Herstellung soll aber durch die folgenden Beispiele näher erläutert werden.

10

Beispiel 1a:

18 mg Insulin und 2 mg FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiertes Insulin wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben mit 12 ml destilliertem Wasser (aus einer

15

Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore) für 1 min bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer (Firma Icamag RCT, Stufe 5) gerührt. Anschließend wurde solange eine 0.1 N wäßrigen HCl-Lösung zugetropft, bis eine klare Lösung erhalten wird und das Insulin vollständig in Lösung gegangen ist.

20

Zu dieser Lösung tropfte man unter Rühren 20 mg Xylanpolysulfat (der Firma Bene-Arzneimittel) zu, das in 4 ml destilliertem Wasser gelöst wurde. Beim Zutropfen trat eine Trübung auf. Nachfolgend wurde langsam 0,1 N NaOH Lösung hinzugeropft, bis die Lösung ganz klar war.

25

Zu dieser Lösung fügte man unter Rühren bei mittlerer Umdrehungszahl eine Lösung von 4 mg Chitosan (der Firma Fluka) in 2 ml Millipore Wasser hinzu. Die Lösung war nun ganz leicht getrübt.

30

Die Vernetzung erfolgte mit Glyoxal (Riedel). Hierzu wurden 400 µl einer wässrigen 2 %-igen Glyoxallösung (entspricht 8 mg reinem Glyoxal) zugegeben. Die entstandene Suspension wurde 10 min lang bei Raumtemperatur gerührt.

Die Suspension wurde hiernach über eine 100 kD Membran (PLHK-Membran der Firma Millipore) ultrafiltriert (Ultrafiltrationszelle Amicon 8050, Stickstoffdruck 0,2 bar, Reinheit > 99,9%), wobei der Rückstand noch mit 5 ml Wasser gewaschen wurde. Das Retentat wurde danach in einen 100 ml Rundkolben überführt, eingefroren (mit einer Mischung aus Isopropanol/Trockeneis) und über Nacht gefriergetrocknet (Modell LDC-1, Christ).

Die Freigabe des Insulins wurde getestet, indem 5 mg der getrockneten Partikel in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,4 (hergestellt mit Sigma Phosphatpuffertabletten) suspendiert und bei 37°C im Trockenschrank erwärmt wurden. Nach 30 min wird eine Probe gezogen, ultrafiltriert (Filter Millipore PLHK) und mittels Fluoreszenzspektroskopie auf FITC-Insulingehalt nach literaturbekannter Methode (Excitationswellenlänge: 494 nm, Emissionswellenlänge: 518 nm) untersucht.

Es zeigte sich, daß nach 30 min nur 30,1 % des Insulins freigesetzt wurden.

Vergleichsbeispiel 1:

Das Beispiel 1 wurde wiederholt. Die entstandenen Partikel wurden jedoch nicht vernetzt. D.h., die entstandene Suspension wurde nicht mit Glyoxal versetzt, sondern direkt, wie oben beschrieben, gewaschen, ultrafiltriert und getrocknet.

Der Freisetzung des FITC-Insulins wurde wie in Beispiel 1 getestet. Es wurde festgestellt, daß 59,4 % des FITC-Insulins in die Lösung abgegeben wurde.

Beispiel 1b:

Die Reaktion wurde ähnlich wie in Beispiel 1 beschreiben durchgeführt: 20 mg Insulin wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben mit 12 ml destilliertem Wasser für 1 min gerührt und solange eine 0,1 N HCl Lösung hinzugeropft, bis eine klare Lösung erhalten wird. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren 20 mg

Xylanpolysulfat, gelöst in 4 ml Wasser, getropft und nachfolgend eine 0,1 N NaOH Lösung hinzugegeben, bis eine klare Lösung entstand. Zu dieser Lösung fügte man unter rühren bei mittlerer Umdrehungszahl eine Lösung von 4 mg Chitosan in 2 ml Wasser. Zusätzlich wurden 20 mg eines Hydrolysates von Poly-(L-
5 Lysinmethylesterfumaramid) (LMF), (die Herstellung kann z.B. nach dem im Patent EP 0 245 840 B1 beschriebenen Verfahren geschehen) in 4 ml Wasser gelöst und hinzugeropft. Anstelle von Glyoxal wurde diesmal zur Vernetzung zuerst 8 µl N-Ethyldiisopropylamin (der Firma Fluka) und dann 13 mg (N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-
10 tetramethyluronium tetrafluoroborat (TSTU, Firma Fluka) unter Rühren hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung und Freigabe wurde analog zu Beispiel 1a durchgeführt, diesmal wurde die freigegebene Menge Insulin mittels literaturbekannter HPLC Methode bestimmt. Nach 4 Stunden wurden in PBS Puffer nur 30% des Insulins freigegeben.
15 Der Vergleichsversuch unter genau gleichen Bedingungen aber ohne Vernetzung ergibt eine Freigabe von 73% Insulin nach 4 Stunden.

Beispiel 1c:

20 Die Reaktion wurde wieder wie in Beispiel 1b beschrieben durchgeführt. Diesmal wurde anstelle von TSTU als Vernetzer 16,4 mg O-(1H Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU, Firma Fluka) verwendet. Die Freigabe des Insulins in Puffer beträgt nach 4 Stunden jetzt nur 14%.

25 Beispiel 2a: Einschluss von Albumin

18 mg Bovines Serum Albumin (BSA) und 2 mg BSA- FITC (der Firma Sigma) wurden in 4 ml destilliertem Wasser für 1 min bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer (Firma IKA - combimag RCT, Stufe 5) gerührt.
30 Zu dieser Lösung tropfte man unter Rühren 20 mg Xylanpolysulfat (der Firma Bene - Arzneimittel) zu, das vorher in 4 ml destilliertem Wasser gelöst wurde.

Zu dieser Lösung fügt man unter Rühren bei mittlerer Umdrehungszahl eine Lösung von 4 mg Chitosan (der Firma Fluka) in 2 ml Millipore - Wasser hinzu. Die Lösung war nun ganz leicht trüb. Zur gesamten Lösung wurden 20 mg LMF (Lysinmethylesterfumaramid - Hydrolysat), gelöst in 4 ml Wasser, zugetropft. Die 5 Vernetzung erfolgte mit 200 μ l einer wässrigen 40%-igen Glyoxallösung (Riedel). Die Suspension wurde 15 min bei Raumtemperatur gerührt.

Aufgereinigt wurde die Suspension mit Hilfe einer Ultrafiltration (Ultrafiltrationszelle Amicon 8050, Stickstoffdruck 1 bar) über eine 300kD Membrane (PLMK der Firma Millipore). Der Rückstand wurde 3 mal mit 30 ml Wasser gewaschen, wobei 100 ml 10 Permeat entstanden.

Das Retentat wurde danach in einen 250 ml Rundkolben überführt, eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet.

Die Freigabe des BSA-FITC wurde getestet, indem 5 mg der getrockneten Partikel in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,4 suspendiert und bei 37°C im Trockenschrank 15 inkubiert wurden. Nach 4 Std. wurde eine Probe gezogen, ultrafiltriert (Filter Millipore PLHK) und mittels Spektralfotometer auf FITC- Gehalt bei 494 nm untersucht und betrug nach 4 Stunden 54% des FITC-BSA.

Zum Vergleich wurden Partikel ohne Zugabe an Vernetzungsmittel unter gleichen Bedingungen hergestellt. Bei diesen Partikeln betrug die Freigabe des FITC-BSA 20 80,5%.

Beispiel 2 b

Die Reaktion wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Anstelle von 25 Glyoxal wurde diesmal zur Vernetzung zuerst 8 μ l N-Ethylidiisopropylamin (der Firma Fluka) und dann 13 mg (N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TSTU, Firma Fluka) unter Rühren hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung und Freigabe wurde analog zu Beispiel 2a durchgeführt. Nach 4 Stunden wurden in PBS Puffer 67% des BSA freigegeben.

Beispiel 2 c

Die Reaktion wurde wieder wie in Beispiel 2b beschrieben durchgeführt. Diesmal wurde anstelle von TSTU als Vernetzer 16,4 mg O-(1H Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N',
5 tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU, Firma Fluka) verwendet. Bei der Verwendung dieses Vernetzers wurden nur 45% des BSA freigegeben.

Beispiel 3a: Einschluss von Tetracyclin

10 Anstelle des Modellarzneistoffes BSA wurden diesmal 20 mg Tetracyclin (Sigma) eingesetzt und nach Beispiel 2a verarbeitet. Die Freigabe des Tetracyclins wurde nach literaturbekannter Methode mittels UV-Spektroskopie bei 356 nm gemessen. Ohne Vernetzung betrug die Freigabe des Tetracyclins 70% nach 4 Stunden. Wurden, wie in Beispiel 2a erwähnt, die Partikel mit 200 µl einer 40%igen
15 Glyoxallösung vernetzt, so betrug die Freigabe von Tetracyclin nur 10%

Beispiel 3b:

Anstelle von Glyoxal wurde als Vernetzer 13 mg TSTU sowie wieder 8 µl N-
20 Ethyldiisopropylamin verwendet. Die Freigabe des Tetracyclins betrug in diesem Falle nur 34%.

Patentansprüche

1. Nanopartikel aufweisend einen biokompatiblen, biologisch abbaubaren
5 Polyelektrolytkomplex aus mindestens einem Polykation und mindestens
einem Polyanion sowie mindestens einen bioaktiven Wirkstoff, wobei die
Nanopartikel dadurch erhältlich sind, daß der Polyelektrolytkomplex während
oder nach seiner Bildung zusätzlich mit mindestens einem Vernetzungsmittel
behandelt wird.
- 10 2. Nanopartikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel
eine mittlere Größe von 50 bis 250 nm aufweisen.
- 15 3. Nanopartikel gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Vernetzungsmittel Glyoxal, TSTU oder
EDAP ist.
- 20 4. Nanopartikel, gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation Chitosan ist.
5. Nanopartikel, gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß das Polyanion Xylanpolysulfat ist
- 25 6. Nanopartikel gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Nanopartikel dadurch erhältlich sind, daß zumindest eines der beiden
geladenen Polymere des Polyelektrolytkomplexes vor, während oder nach der
Bildung des Komplexes zusätzlich mit mindestens einem Mittel behandelt wird,
welches die Oberfläche der Nanopartikel modifiziert.
- 30 7. Nanopartikel gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der
oberflächenmodifizierende Stoff einen Carrier enthält.

8. Verfahren zur Herstellung von Partikeln gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man einen Wirkstoff in gebundener oder ungebundener Form, eine wäßrige Lösung mindestens eines Polykations und eine wäßrige Lösung mindestens eines Polyanions zusammenbringt und anschließend der Polyelektrolyt in nanopartikulärer Form entsteht oder gegebenenfalls in eine nanopartikuläre Form überführt wird, dadurch gekennzeichnet, daß der nanopartikuläre Polyelektrolytkomplex mit einem Vernetzungsmittel behandelt wird.
5
9. Verwendung der Partikel gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 oder erhalten nach dem Anspruch 9 als orale Applikationsform.
10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/01452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 99 18934 A (UNIV VANDERBILT) 22 April 1999 (1999-04-22) page 6, line 7-27 page 8, line 25 - page 9, line 6 page 14, paragraphs 14-18 examples 12,18 ---	1,2,8
A	EP 0 454 044 A (HOECHST AG) 30 October 1991 (1991-10-30) cited in the application page 1, line 1-8 examples 2,3 claims page 1, line 54 - page 2, line 4 ---	1,4,5,8

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 July 1999	27/07/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 340 2012	Authorized officer I. G. Gaetano R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/01452

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92 17167 A (BIOTECH AUSTRALIA PTY LTD) 15 October 1992 (1992-10-15) cited in the application page 5, line 30 - page 6, line 32 page 13, line 20-25 page 13, line 36 - page 15, line 20 claims ----	1,6,7
A	EP 0 427 190 A (HOECHST AG) 15 May 1991 (1991-05-15) page 2, line 23-31 page 3, line 7-42 example 3 ----	1,4,5,8, 9
A	EP 0 671 169 A (HOECHST AG) 13 September 1995 (1995-09-13) page 1, line 1-27 page 5, line 35-37 examples 10,11 -----	1-3,6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/EP 99/01452

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9918934	A	22-04-1999	NONE		
EP 0454044	A	30-10-1991	DE	4013110 A	31-10-1991
			DE	4035187 A	07-05-1992
			AT	131042 T	15-12-1995
			CA	2041093 A	26-10-1991
			DE	59107006 D	18-01-1996
			DK	454044 T	22-04-1996
			ES	2081384 T	01-03-1996
			IE	70747 B	30-12-1996
			JP	4225915 A	14-08-1992
			US	5700459 A	23-12-1997
WO 9217167	A	15-10-1992	AT	156705 T	15-08-1997
			AU	664365 B	16-11-1995
			AU	1558092 A	02-11-1992
			CA	2084194 A	03-10-1992
			DE	69221568 D	18-09-1997
			DE	69221568 T	19-03-1998
			DK	531497 T	23-03-1998
			EP	0531497 A	17-03-1993
			ES	2108111 T	16-12-1997
			GR	3025328 T	27-02-1998
			HK	1002252 A	07-08-1998
			NZ	242220 A	27-04-1994
EP 0427190	A	15-05-1991	DE	3937283 A	16-05-1991
			JP	3170435 A	24-07-1991
			PT	95823 A	13-09-1991
EP 0671169	A	13-09-1995	DE	4407898 A	14-09-1995
			AU	685577 B	22-01-1998
			AU	1470195 A	21-09-1995
			CA	2144216 A	10-09-1995
			FI	951053 A	10-09-1995
			HU	72033 A	28-03-1996
			JP	7258114 A	09-10-1995
			NO	950889 A	11-09-1995
			NZ	270648 A	26-09-1995
			US	5674531 A	07-10-1997
			ZA	9501910 A	13-11-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01452

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K9/51

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
E	WO 99 18934 A (UNIV VANDERBILT) 22. April 1999 (1999-04-22) Seite 6, Zeile 7-27 Seite 8, Zeile 25 – Seite 9, Zeile 6 Seite 14, Absätze 14-18 Beispiele 12,18 ---	1,2,8
A	EP 0 454 044 A (HOECHST AG) 30. Oktober 1991 (1991-10-30) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeile 1-8 Beispiele 2,3 Ansprüche Seite 1, Zeile 54 – Seite 2, Zeile 4 ---	1,4,5,8 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20. Juli 1999

27/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

La Gaetana . R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

.nationale Aktenzeichen

PCT/EP 99/01452

C.(Fortssetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 92 17167 A (BIOTECH AUSTRALIA PTY LTD) 15. Oktober 1992 (1992-10-15) in der Anmeldung erwähnt Seite 5, Zeile 30 – Seite 6, Zeile 32 Seite 13, Zeile 20-25 Seite 13, Zeile 36 – Seite 15, Zeile 20 Ansprüche ----	1,6,7
A	EP 0 427 190 A (HOECHST AG) 15. Mai 1991 (1991-05-15) Seite 2, Zeile 23-31 Seite 3, Zeile 7-42 Beispiel 3 ----	1,4,5,8, 9
A	EP 0 671 169 A (HOECHST AG) 13. September 1995 (1995-09-13) Seite 1, Zeile 1-27 Seite 5, Zeile 35-37 Beispiele 10,11 -----	1-3,6,7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01452

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9918934	A	22-04-1999	KEINE		
EP 0454044	A	30-10-1991	DE 4013110 A		31-10-1991
			DE 4035187 A		07-05-1992
			AT 131042 T		15-12-1995
			CA 2041093 A		26-10-1991
			DE 59107006 D		18-01-1996
			DK 454044 T		22-04-1996
			ES 2081384 T		01-03-1996
			IE 70747 B		30-12-1996
			JP 4225915 A		14-08-1992
			US 5700459 A		23-12-1997
WO 9217167	A	15-10-1992	AT 156705 T		15-08-1997
			AU 664365 B		16-11-1995
			AU 1558092 A		02-11-1992
			CA 2084194 A		03-10-1992
			DE 69221568 D		18-09-1997
			DE 69221568 T		19-03-1998
			DK 531497 T		23-03-1998
			EP 0531497 A		17-03-1993
			ES 2108111 T		16-12-1997
			GR 3025328 T		27-02-1998
			HK 1002252 A		07-08-1998
			NZ 242220 A		27-04-1994
EP 0427190	A	15-05-1991	DE 3937283 A		16-05-1991
			JP 3170435 A		24-07-1991
			PT 95823 A		13-09-1991
EP 0671169	A	13-09-1995	DE 4407898 A		14-09-1995
			AU 685577 B		22-01-1998
			AU 1470195 A		21-09-1995
			CA 2144216 A		10-09-1995
			FI 951053 A		10-09-1995
			HU 72033 A		28-03-1996
			JP 7258114 A		09-10-1995
			NO 950889 A		11-09-1995
			NZ 270648 A		26-09-1995
			US 5674531 A		07-10-1997
			ZA 9501910 A		13-11-1995